

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ В РЕПЕРфуЗИОННОМ ПЕРИОДЕ ПРИ МОДУЛЯЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ

Ходосовский М.Н., Зинчук В.В., Лис Р.Е., Виноградова Л.Е.

Государственный медицинский университет, г.Гродно

The dysbalance of vasodilator and vasoconstrictor production has an important role in the development of the hepatic reperfusion damage. We aimed to study the influence of the changes in L-arginine-NO system (by intravenous infusion of L-arginine (NO synthase substrate; 300 mg/kg) or Nw-nitro-L-arginine (L-NNA; NO synthase inhibitor; 15 mg/kg)) on the hepatic morphology and function during ischemia and reperfusion in rabbits. Hepatic ischemia was induced by a ligation of a hepatica propria for 30 min; the reperfusion lasted 120 min. The hepatic morphology was estimated in the preparations stained by hematoxylin-eosine. The hepatic function was evaluated by activities of alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) in plasma. We showed that the hepatic ischemia-reperfusion led to the development of the hepatocyte hydropic balloon dystrophy and higher plasma ALAT and ASAT activities. L-arginine infusion during the reperfusion ameliorated the severity of hepatic reperfusion damage, with maximal sparing of parenchyma comparing with other groups of animals. In this group the plasma ALAT and ASAT activities did not significantly changed during the ischemia-reperfusion. Inhibition of NO synthase by L-NNA resulted in the more serious disorder of the hepatic morpho-functional state during the reperfusion. Plasma ALAT and ASAT activities rose at the end of reperfusion, the threshold necrotic foci were observed around the portal vein, and the leucocyte infiltration into parenchyma was shown. This leucocyte infiltration during the NO synthase inhibition indicated the more active adhesive echanisms - possibly, due to NO deficiency.

Большое значение в патогенезе реперфузионных нарушений в печени имеет дисфункция эндотелия [4]. Эндотелиальные клетки регулируют тонус гладкомышечных клеток сосудов через высвобождение различных местных гормонов или аутокоидов. К ним относятся метаболиты арахидоновой кислоты (например, простаглицлин, тромбоксан А₂ и лейкотриен В₄), вырабатываемый эндотелием релаксирующий фактор, идентифицированный как оксид азота (NO) и семейство эндотелинов [2]. Эндотелиальные клетки могут модифицировать воспалительный ответ, регулируя экспрессию молекул межклеточной адгезии [2]. NO, взаимодействуя с супероксидным анионом, может образовывать мощный окислитель – пероксинитрит, который считается рядом авторов

ответственным за развитие повреждений в печени при реперфузии [3]. Вместе с тем, показан положительный эффект при ишемии-реперфузии печени L-аргинина, субстрата для синтеза NO в организме [5], что указывает на неоднозначную роль оксида азота при данной патологии. Цель исследования - изучить морфофункциональное состояние печени при модуляции L-аргинин-NO системы.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на взрослых кроликах-самцах весом 3,5-4,5 кг. Анестезия поддерживалась внутривенной инфузией калипсола (1,5 мг/кг/мин). Вводили катетеры: один - в *v. hepatica* для забора печёночной венозной крови, а другой - в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Ишемию печени в течение 30 мин вызывали временным пережатием *a. hepatica propria*, реперфузионный период длился 120 мин. Забор образцов крови для оценки активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) осуществляли до, в конце ишемии и через 120 минут после её прекращения колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом.

Животные были разделены на несколько групп. В 1-ой группе кроликов (n=10) моделировали ишемию-реперфузию печени без модуляции L-аргинин-NO системы. Во 2 -ой группе (n=7) перед выполнением ишемии осуществляли инфузию неселективного ингибитора NO-синтазы - N^G-нитро-L-аргинина (L-NNA, "Sigma") в дозе 15 мг/кг. В 3-ей группе (n=8) за 5 мин. до начала реперфузии проводили инфузию L-аргинина (300 мг/кг, Институт биоорганической химии РАН РБ). В конце реперфузии брали ткань печени для оценки общей морфологической картины печени. В качестве контроля использовали ткани печени, взятые у животных до выполнения ишемии (n=6) и непосредственно после неё (n=5). Из печени, фиксированной в смеси Карнуа, готовили гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Оценка общей морфологической картины печени с помощью окраски препаратов гематоксилином и эозином выявила, что остановка кровотока по *a. hepatica propria* у опытных животных приводило к венозному застою: резко расширены центральные дольковые вены и синусоиды, в них наблюдался эритростаз на 30-ой мин ишемии. По-видимому, венозный застой обусловлен замедлением синусоидного кровотока вследствие остановки артериального кровоснабжения при данном виде ишемии и нарушения так называемого "сифонного" эффекта [1].

На 120-ой мин реперфузии в печени у опытных животных 1-ой группы у большей части гепатоцитов наблюдалась гидropическая, а также

«баллонная» дистрофия с кариолизисом. Относительно сохранившиеся гепатоциты наблюдались в перипортальных участках (1-я зона ацинуса по Раппопорту). Центральные вены расширены, в них наблюдался эритростаз. Данные изменения морфологической картины органа сопровождалось ростом активности АЛАТ и АсАТ в плазме крови в конце реперфузионного периода, хотя после ишемии уровень активности данных ферментов не изменялся. Так, в плазме печёночной венозной крови на 120-ой мин реперфузии по отношению к исходному уровню активность АЛАТ и АсАТ к концу реперфузии увеличилась на 96,3% ($p<0,001$) и 93,2% ($p<0,001$) соответственно. В плазме смешанной венозной крови наблюдались схожие изменения активности данных трансаминаз. Нарушения морфофункционального состояния печени в реперфузионном периоде могут быть следствием усиления процессов ПОЛ в мембранах, приводящих к нарушениям физико-химических свойств липидной фазы мембран («делипидизация мембран»), конформации, функциональной активности и топографии белково-липидных комплексов мембран, повреждению Na^+/K^+ - насоса и увеличению проницаемости мембран для ионов Na^+ и Ca^{2+} с последующим внутриклеточным отёком [6].

При оценке общей морфологической картины печени у кроликов, получавших L-NNA, установлено, что перипортально наблюдаются как относительно сохранившиеся гепатоциты, так и клетки с гидропической, «баллонной» дистрофией и кариолизисом. Перипортально имеются очаги порогового некроза, инфильтрация лейкоцитов в паренхиму. Кроме того, встречаются случаи венозного застоя с гемолизом эритроцитов как внутривенно, так и внутри синусоидов. У кроликов данной группы установлено повышение активности АЛАТ и АсАТ в плазме обоих образцов крови в конце реперфузионного периода. Так уровень АЛАТ в плазме печёночной и смешанной венозной крови превышал исходный для каждого образца на 73,7% ($p<0,05$) и 94,9% ($p<0,05$) соответственно. Активность АсАТ плазмы данных образцов крови в этот период выросла на 103,1% ($p<0,01$) и 164,3% ($p<0,05$) соответственно. Повышение активности АЛАТ и АсАТ в плазме крови свидетельствует на развитие повреждений печени в реперфузионном периоде. Инфильтрация лейкоцитов в паренхиму печени указывает на усиление активности механизмов адгезии, которые могут быть обусловлены дефицитом NO. Это же могло стать причиной спазма сосудов и венозного застоя, наблюдаемого в некоторых случаях в конце реперфузии.

При инфузии L-аргинина, установлено, что «баллонная» дистрофия и кариолизис встречаются очагами и далеко не во всех случаях, гепатоциты имеют нормальный вид. Синусоиды несколько расширены, что может быть обусловлено вазодилатирующим эффектом NO. Сохранность паренхимы максимальная по сравнению с остальными опытными группами. Активность АЛАТ и АсАТ в плазме печёночной и смешанной

венозной крови на протяжении ишемии-реперфузии в этой группе опытных животных достоверно не изменялась. Возможно, защитное влияние L-аргинина при реперфузии связано с улучшением условий микроциркуляции в печени (расширение синусоидов), что способствовало более быстрому выведению токсических метаболитов, в т.ч. продуктов ПОЛ.

Проведенные исследования показали, что создаваемая модель ишемии-реперфузии во всех сериях сопровождалась нарушением функционального состояния печени и морфологической картины органа, однако степень их выраженности была неодинаковой, наименьшая в условиях инфузии L-аргинина. Модуляция L-аргинин-NO системы может как усугублять, так и уменьшать степень тяжести реперфузионных повреждений печени, что свидетельствует о сложном характере взаимодействия ее составляющих компонентов, нарушение которого является одним из патогенетических звеньев данной патологии.

Проведенные исследования показали, что ингибирование NO-синтазы с помощью L-NNA приводит к более тяжёлым нарушениям морфофункционального состояния печени при реперфузии. Инфузия L-аргинина кроликам в постишемическом периоде способствует уменьшению степени тяжести реперфузионных повреждений органа.

Литература

1. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция.- М.: Медицина, 1984.— 432 с.
2. Grace P.A. Ischaemia-reperfusion injury // Br. J. Surg.- 1994.- Vol. 81, № 5.- P. 637-647.
3. Isobe M., Katsuramaki T., Kimura H. et al. Role of inducible nitric oxide synthase on hepatic ischemia and reperfusion injury // Transplant. Proc.- 2000.- Vol. 32, № 7.- P. 1650-1652.
4. Man K., Fan S.T., Lo C.M. et al. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intra-graft gene expression // Ann. Surg.- 2003.- Vol. 237, № 2.- P. 256-264.
5. Rivera-Chavez F.A., Toledo-Pereyra L.H., Dean R.E. et al. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers // J. Invest. Surg.- 2001.- Vol. 14, № 5.- P. 267-273.
6. Zinchuk V.V., Khodosovsky M.N., Maslakov D.A. Influence of different oxygen modes on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant status during hepatic ischemia/reperfusion // Physiol. Res.- 2003.- Vol.52, № 5.- P. 533-544.